

ФГОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Направление «Медицина»

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему: Влияние двухсосудистой ишемии головного мозга на систему
антиоксидантной защиты и выживаемость нейронов
в коре мозга стареющих самцов крыс Wistar.

Выполнила: студентка 15С05 группы
Фокина Екатерина Александровна

Научный руководитель:
к.б.н., доцент
Голованова Наталья Эриковна

Научный консультант:
д.б.н. Шпаков Александр Олегович

Санкт-Петербург
2021 год

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Старение и морфологические особенности стареющего мозга.....	9
1.2. Окислительный стресс в качестве основного элемента старения клетки	11
1.3. Патогенез ишемического повреждения головного мозга	13
1.4. Ферментативные и неферментативные антиоксидантные системы ...	16
1.5. Связь между окислительным стрессом и запуском апоптоза.....	17
1.6. Ишемия-реперфузия в мозге молодых животных	19
1.7. Ишемия-реперфузия в мозге стареющих животных	20
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	22
2.1. Экспериментальная модель глобальной двухсосудистой ишемии переднего мозга крыс с гипотензией и реперфузией	22
2.2. Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени, совмещенная с обратной транскрипцией	23
2.2.1. Выделение тотальной РНК.....	23
2.2.2. Обратная транскрипция, совмещенная с полимеразной цепной реакцией	24
2.2.3. Количественная полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени	24
2.2.4. Анализ данных полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени	25
2.3. Изучение уровня продуктов перекисного окисления липидов	25
2.3.1. Выделение липидов из тканей головного мозга	25
2.3.2. Метод количественного определения диеновых и триеновых конъюгатов	26
2.3.3. Метод количественного определения оснований Шиффа.....	27
2.3.4. Метод определения содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой	27
2.4. Определение активности Na^+, K^+ -АТФазы	28

2.5. Статистическая обработка данных	28
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	29
3.1. Изучение влияния ишемии и реперфузии различной длительности на активность Na^+, K^+ -АТФазы и экспрессию ее субъединиц в коре головного мозга старых крыс.....	29
3.2. Изучение влияния ишемии и реперфузии различной продолжительности на накопление продуктов перекисного окисления липидов в коре головного мозга старых крыс.	32
3.3. Изучение влияния ишемии и реперфузии различной длительности на интенсивность апоптотических процессов в мозге стареющих крыс.	33
3.4. Изучение экспрессии генов, кодирующих белки антиоксидантной системы, в условиях ишемии и реперфузии различной продолжительности в мозге стареющих крыс.....	35
3.5. Исследование изменения экспрессии гена нейрональной NO-синтазы в ответ на ишемию-реперфузию в стареющем мозге.....	37
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	39
ВЫВОДЫ.....	40
БЛАГОДАРНОСТИ	41
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	42
ПРИЛОЖЕНИЕ	52

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДК – диеновые конъюгаты

ИР – ишемия-реперфузия

МДА – малоновый диальдегид

ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения

ОШ – основания Шиффа

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СОД – супероксиддисмутаза

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ТК – триеновые конъюгаты

ВВЕДЕНИЕ

Острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) и, в частности, ишемический инсульт остается одной из наиболее частых причин смертности и инвалидизации в России и в мире [1]. У лиц, перенесших инсульт, развивается неврологический дефицит различной степени тяжести, они нуждаются в постоянном уходе, не могут самостоятельно обеспечивать свою жизнедеятельность. ОНМК существенно влияет на качество жизни пациентов, на их участие в социальной и экономической жизни государства. Объективным показателем «бремени заболевания» является число лет жизни, скорректированных по нетрудоспособности (DALY), – широко используемый в общественном здравоохранении инструмент. DALY позволяет вычислить количество активных лет жизни, утраченных в связи со смертью или инвалидностью, по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни в данном регионе для здорового человека [2]. Согласно последнему глобальному исследованию бремени болезней, доля ишемического инсульта в общей структуре DALY очень велика, и имеет тенденцию к росту [3, 4]. В России цереброваскулярная болезнь находится на втором месте по значимости по данному показателю среди всех исследованных причин смерти и инвалидности [5].

Наибольшая заболеваемость ишемическим инсультом приходится на группу лиц старшего возраста (55+ лет), и каждые последующие десять лет жизни риск инсульта увеличивается вдвое [6]. В сочетании с общемировой тенденцией к увеличению ожидаемой продолжительности жизни [7], можно заключить, что распространенность данной патологии, как и смертность от нее, будет только расти.

Ишемический инсульт возникает в результате нарушения притока крови к веществу головного мозга, наиболее часто – вследствие тромбоза мозговых артерий. Сосудистая патология приводит к развитию биохимических реакций, включающих деструкцию активными формами кислорода (АФК) молекул белков, нуклеиновых кислот и липидов. Неконтролируемое

свободнорадикальное окисление становится причиной истощения эндогенных антиоксидантных систем и нарушению внутриклеточной регуляции [8]. Следствием вышеуказанных патологических процессов становится гибель нейронов путем некроза, апоптоза или аутофагии [9]. Тяжесть повреждения, в первую очередь, зависит от длительности ишемического воздействия, а также от возраста пациента и предшествующего функционального состояния организма [10].

Восстановление кровотока – медикаментозное или спонтанное – запускает процесс реперфузии. Несмотря на закономерное предположение о положительном влиянии ранней реперфузии, уже в 1970-е годы оно было поставлено под сомнение сообщениями о парадоксальном усилении повреждения при восстановлении кровотока [11]. Реперфузия и сопровождающая ее реоксигенация индуцирует вторую, более мощную волну генерации АФК [12-14], и это явление называют «реперфузионным повреждением». В настоящее время это одна из наиболее активно развивающихся областей медицины. Реперфузионное повреждение создает дополнительную проблему для изучения последствий лечения ишемических заболеваний и профилактики их осложнений.

В связи с этим, одним из наиболее актуальных направлений в экспериментальной медицине является изучение патогенеза ишемического повреждения нейронов и поиск эффективных нейропротекторов для его предупреждения и лечения. Успех доклинических испытаний потенциальных нейропротекторов и возможность применения результатов этих испытаний в клинической практике во многом зависит от выбранной модели заболевания. Большинство исследований проводится на животных молодого и среднего возраста (3-10 месяцев). Однако подобный выбор возраста противоречит эпидемиологии заболевания, и этот факт может ставить под сомнение возможность трансляции результатов таких исследований в реальную клиническую практику. Все это позволяет судить о целесообразности выбора

в качестве моделей старых или стареющих животных, возраста 18 месяцев и более.

Для определения параметров эффективности исследуемых препаратов необходимо исследовать биохимический профиль стареющего мозга, изменения биохимических и нейрофизиологических процессов в ответ на патологическое воздействие, оценивать динамику этих изменений.

Изучение проблемы ишемического и реперфузионного повреждения мозга актуально не только для таких патологий, как ишемический инсульт и транзиторная ишемическая атака, но и для ряда нейродегенеративных заболеваний, в патогенезе которых – избыточное накопление АФК в нейронах. К таким нозологиям относятся болезнь Альцгеймера, хорей Гентингтона, боковой амиотрофический склероз [15].

Целью данной работы стало изучение биохимических показателей окислительного стресса, апоптоза и вазодилатации в нейронах головного мозга стареющих крыс в условиях ишемии-реперфузии (ИР) различной длительности.

Ишемия и следующая за ней реперфузия приводит к гибели нейронов двумя основными путями: некроз, как результат окислительного повреждения, и апоптоз – индуцированная через различные механизмы запрограммированная смерть нейронов. Таким образом, оценивать «выживаемость» нейронов следует по различным биомаркерам, характеризующим оба этих процесса.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Исследовать влияние двухсосудистой ишемии-реперфузии головного мозга с гипотензией на накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в коре головного мозга стареющих крыс (возраст 22-24 месяцев).
2. Изучить влияние двухсосудистой ишемии-реперфузии головного мозга с гипотензией на уровень экспрессии генов, кодирующих белки

апоптоза (*Bax*, *Bcl-2*) и ферменты антиоксидантной защиты (*Sod1*, *Sod2*, *Cat*), а также активность фермента Na^+, K^+ -АТФазы.

3. Исследовать особенности вышеперечисленных параметров у старых крыс в сравнении с молодыми в условиях изучаемой ишемии-реперфузии головного мозга.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Старение и морфологические особенности стареющего мозга

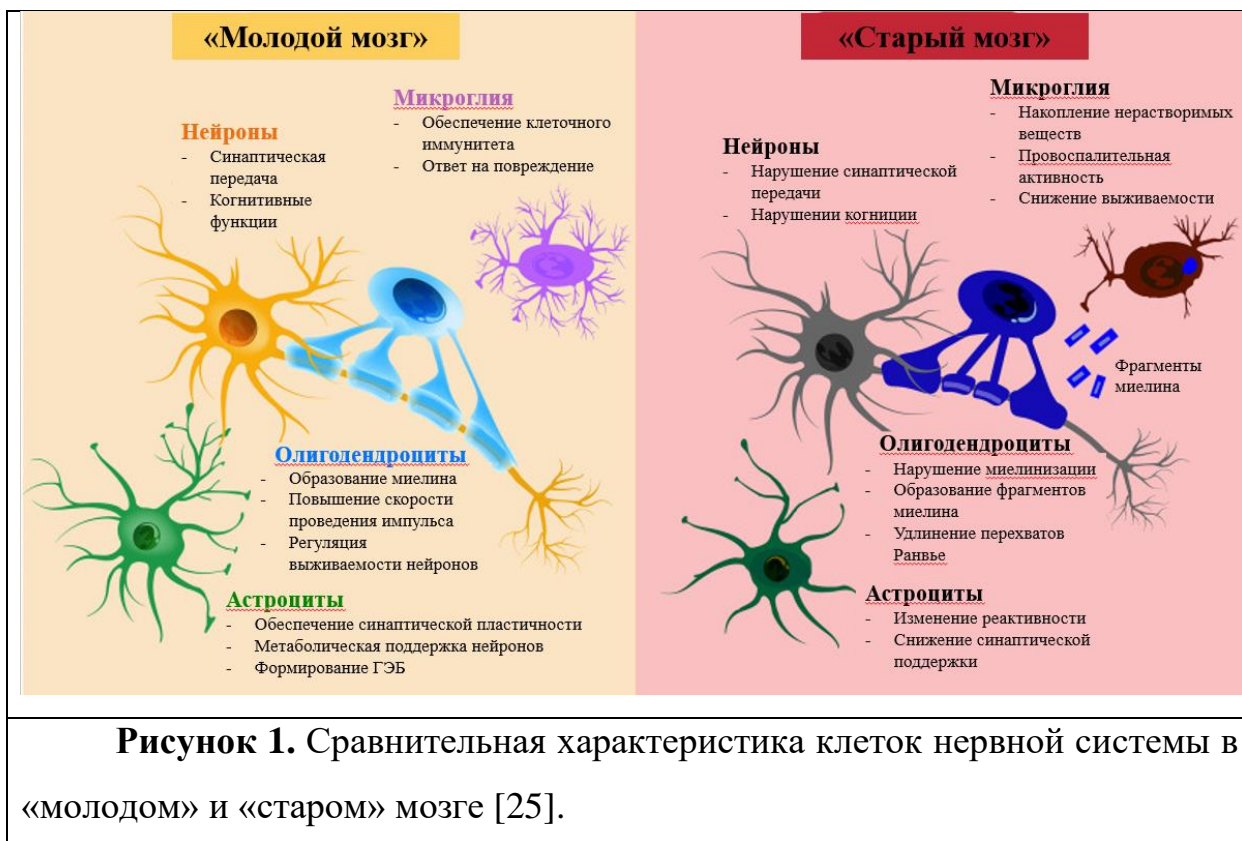
Несмотря на множество описанных в литературе теорий старения, ни одна из них не является общепринятой в научном сообществе. Глобально все теории делят на две группы: сторонники первой из них полагают, что старение – есть запрограммированный, эволюционно обоснованный процесс; вторые считают, что старение является результатом накопления большого количества повреждений клеточных структур и ошибок в генетическом материале [16]. Множественность теорий старения, подтвержденных экспериментально, позволяет предположить, что старение – есть интегральное воздействие генетики и окружающей среды, а не следствие чего-либо одного [17, 18].

К характерным возрастным изменениям головного мозга относят уменьшение его объема (в среднем на 11% с 50 до 90 лет) и расширение вентрикулярной системы [19]. Причем уменьшение объема в основном происходит не за счет уменьшения количества нейронов, а вследствие снижения количества их шипиков и соответствующего уменьшения количества синапсов [20]. Длина миелинизированных аксонов при этом уменьшается примерно на 50%.

Объем вышеуказанных изменений варьирует для разных отделов головного мозга, но преимущественно они выражены в лобной и височной долях, скорлупе, таламусе и прилежащем ядре [21, 22]. До сих пор нет точных данных, является ли данная атрофия частью нормального старения или представляет из себя начало нейродегенерации как патологии [22], хотя некоторые маркеры нейродегенеративных заболеваний, в том числе и амилоидогенные белки, обнаруживаются при проведении аутопсии здоровых при жизни лиц [23, 24].

Возрастным изменениям подвергаются также и клетки глии, составляющей практически половину всех клеток мозга. Основными функциями глиальных клеток являются доставка энергетического субстрата нейронам, обеспечение иммунных реакций, миелинизация нервных волокон,

также они поддерживают гомеостаз и обеспечивают пластичность нейронов. С возрастом глиальные клетки претерпевают морфологические и функциональные изменения, которые снижают их нейропротекторную роль: микроглия демонстрирует усиленный воспалительный ответ, астроциты снижают синаптическую поддержку, а олигодендроциты изменяют свою способность к миелинизации (**Рисунок 1**) [25]. Эти изменения приводят к повышенной уязвимости клеток нервной ткани.



Изменения васкулярной системы выражены редукцией плотности сети микрососудов, в дополнение к этому изменяется структура сосудистой стенки: она становится более проницаемой для молекул и при этом резистентной по отношению к действию вазоактивных веществ. Следует упомянуть, что на поверхности эндотелия снижается экспрессия рецепторов к нейротрофическим и ростовым факторам. [26].

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) у старых животных отличается от ГЭБ у молодых животных повышенной иммунореактивностью астроглии, повышением количества астроцитов и снижением экспрессии Р-

гликопротеина, который является основным переносчиком на ГЭБ. Наряду с этим, существенно уменьшается количество плотных контактов, и результатом такой трансформации становится нарушение транспорта веществ через ГЭБ [27].

Исследования функции и морфологии митохондрий в стареющем мозге выявили многочисленные возрастные изменения, в том числе увеличение и фрагментацию митохондрий, окислительное повреждение митохондриальной ДНК (мтДНК), изменения в цепи переноса электронов, увеличение количества митохондрий с деполяризованными мембранами [28]. Патология митохондрии является центром митохондриальной теории старения. Исходя из ее положений, триггером возрастных изменений становится накопление фенотипически значимого количества мутаций в мтДНК [29], причем каждая клетка должна содержать либо одну мутацию, либо один тип мутаций [17].

К негативным изменениям, сопровождающим процессы старения на молекулярном уровне, относится повышенное накопление активных форм кислорода, а также случайных поломок в ДНК [28, 30, 31], как в ядерной, так и в митохондриальной. Важно отметить, что в мтДНК мутации выявляются чаще, так как она наследуется по материнской линии и реплицируется в течение всей жизни организма [17, 32], и это приводит к снижению эффективности ее репарации [33].

1.2. Окислительный стресс в качестве основного элемента старения клетки

Стареющие культуры клеток характеризуются снижением клеточного энергетического обмена, замедлением синтеза белков, усилением стресса эндоплазматического ретикулума, нарушением репликации и репарации ДНК, накоплением случайных мутаций.

Исходным патогенетическим фактором, приводящим к функциональным нарушениям при старении, являются дисфункции митохондрий, в сочетании с возрастным снижением активности системы антиоксидантной защиты, что ведет к усиленному накоплению АФК,

развитию окислительного стресса и активации обусловленных этим процессов апоптоза [34, 35]. Окислительный стресс представляет собой комплекс патологических процессов повреждения тканей. Причиной этого явления являются чрезмерная выработка АФК и активных форм азота и/или сниженная способность к нейтрализации АФК, что выражается в дисбалансе между прооксидантной и антиоксидантной системами [36].

Показано, что у стареющих животных повышается уровень внутриклеточных АФК и активных форм азота, снижается мембранный потенциал митохондрий и снижается выработка АТФ в них, что приводит к нарушению митохондриальной энергетики [37-39]. В тканях стареющих животных изменяется морфология митохондрий, отмечается накопление АФК, и это ведет к мутациям в митохондриальной ДНК. При этом система защиты митохондриальной ДНК от поломок функционирует менее эффективно в сравнении с таковой у ядерной ДНК [40].

Липиды и белки клетки, в том числе дыхательные, становятся мишенью для окисления, вследствие чего функция их теряется, и они подвергаются агрегации [39]. В физиологических условиях только 1-2% молекулярного кислорода превращается в супероксид, однако в стареющем мозге этот процент существенно увеличивается вследствие снижения пула антиоксидантных молекул. Возрастающая окислительная нагрузка в нейрональном микроокружении приводит к повышенному окислению липидов, белков и ДНК и образованию таких побочных продуктов метаболизма, как органические перекиси, альдегиды, спирты, кетоны [26]. Помимо прочего, при перекисном окислении арахидоновой кислоты – одного из компонентов омега-6-полиненасыщенных жирных кислот – образуется высокореакционное соединение – 4-гидрокси-транс-2-ноненаль. Это соединение способно модифицировать АТФ-синтазу и тем самым подавлять выработку АТФ в нейронах [41].

В старом мозге развивается биоэнергетический дефицит, который приводит к состоянию хронического окислительного стресса [42]. Также в нем

снижена генерация энергии, в том числе за счет окислительного повреждения систем ее продукции [43]. Таким образом, нервная ткань старого мозга становится более подверженной повреждающим явлениям вследствие дефицита энергии для адаптации к ним, которая включает в себя процессы репарации ДНК и восстановления посттрансляционной модификации белков.

1.3. Патогенез ишемического повреждения головного мозга

Ограничение интенсивности мозгового кровотока приводит к снижению образования АТФ, истощению клеточных энергетических депо. Вследствие этого нарушается работа мембранных транспортеров и дестабилизируется ионный градиент, необходимый для поддержания жизнедеятельности клеток. Происходит деполяризация клеточных мембран и высвобождение глутамата во внеклеточное пространство из везикул. Дальнейшая активация NMDA-рецепторов приводит к резкому увеличению внутриклеточной концентрации ионов кальция и гибели нейронов [44]. Восстановление кровообращения и поступление кислорода с током крови опосредует следующий виток патологического процесса, связанный с усиленным накоплением АФК и окислительным повреждением молекул.

Ишемия-реперфузия (ИР) включает в себя три патогенетические стадии [43]:

I. Прекращение поступления кислорода приводит к усилению гликолиза в нейронах → накопление лактата → снижение рН клетки → разобщение окислительного фосфорилирования

II. Возобновление кровообращения → поступление кислорода → замедление гликолиза → образование АФК → запуск перекисного окисления липидов

III. Продолжительная реперфузия (более нескольких минут) → запуск адаптационных процессов → возобновление окислительного фосфорилирования, повышение рН, синтез белков антиоксидантной системы.

Достоверно известно, что основным патологическим элементом в развитии ишемического и реперфузионного повреждения является избыточное накопление АФК.

АФК играют важную роль в функционировании клетки, как в условиях нормы, так и при патологии. В зависимости от интенсивности патологического фактора, АФК могут выступать индукторами адаптационных процессов, индукторами апоптоза, а также оказывать прямое деструктивное воздействие на клеточные структуры [45]. Основными патологическими эффектами АФК являются:

- ПОЛ биологических мембран,
- индукция перекрестного сшивания макромолекул ДНК, РНК, полисахаридов и полипептидов,
- повреждение эндотелия и повышение проницаемости ГЭБ,
- участие в процессах воспаления и в реализации иммунного ответа путем стимуляции экспрессии и секреции цитокинов и молекул клеточной адгезии,
- стимуляция гидролиза полисахаридов,
- повышенное высвобождение возбуждающей аминокислоты глутамата, которая способствует развитию отсроченной гибели нейронов после церебральной ишемии [36].

Ткань головного мозга особенно чувствительна к патологическому воздействию окислительного стресса. В первую очередь, это обусловлено высоким потреблением кислорода нейронами. Энергия затрачивается на поддержание работы систем мембранных транспортеров, функциональная активность которых критически важна для поддержания процессов жизнедеятельности нейронов, везикулярного транспорта и синтеза нейромедиаторов [46]. Помимо этого, нейроны содержат большое количество окисляемого субстрата и менее активную по сравнению с другими тканями систему антиоксидантной защиты, а также им присуще высокое содержание катионов окисленного железа, которое является индуктором АФК [47].

Abramov и соавторы. описали три основных пути генерации АФК при экспериментальной ИР [48] .

В ответ на кислородную депривацию концентрация АФК повышается в три волны:

- Непосредственно в момент наступления депривации и продолжается 3-7 минут в нейронах неокортекса и гиппокампа. Затем концентрация АФК падает в течение 20 минут;
- При продолжении депривации кислорода после указанного периода АФК вновь повышаются, причем объем их выработки в коре становится выше, чем в первую волну;
- С началом реоксигенации скорость выработки АФК растет еще более стремительно и достигает значений, более чем в 2.5 раза превышающих базальный уровень АФК.

Основными источниками АФК при ишемическом повреждении являются: ксантиноксидаза, НАДФН-оксидаза, дыхательная цепь митохондрий, моноаминоксидаза и другие ферменты, ответственные за катализ окислительно-восстановительных реакций с участием кислорода [49].

Разные источники влияют на генерацию АФК в различные фазы ишемического и реперфузионного повреждения: разобщение дыхательной цепи митохондрий приводит к снижению базальной секреции АФК, и к полному отсутствию первой волны генерации АФК. Параллельно с этим скорость и продолжительность генерации АФК во вторую и третью волну увеличивается. Ксантиноксидаза в большей степени ответственна за генерацию АФК во вторую волну, предположительно, за счет того, что истощение запасов АТФ ведет к превращению адениннуклеотидов в ксантин и гипоксантин [50]. Ингибирование НАДФН-оксидазы приводит к селективному снижению скорости накопления АФК в третью волну – как полагают, активация фермента происходит под влиянием изменения содержания кальция в клетке [51]. Ингибирование глутаматергических NMDA рецепторов, в том числе ответственных за поступление ионов кальция в

клетку, приводит к снижению образования АФК в фазу реоксигенации. Вызвано это избыточным накоплением глутамата во внеклеточной среде в результате ишемии.

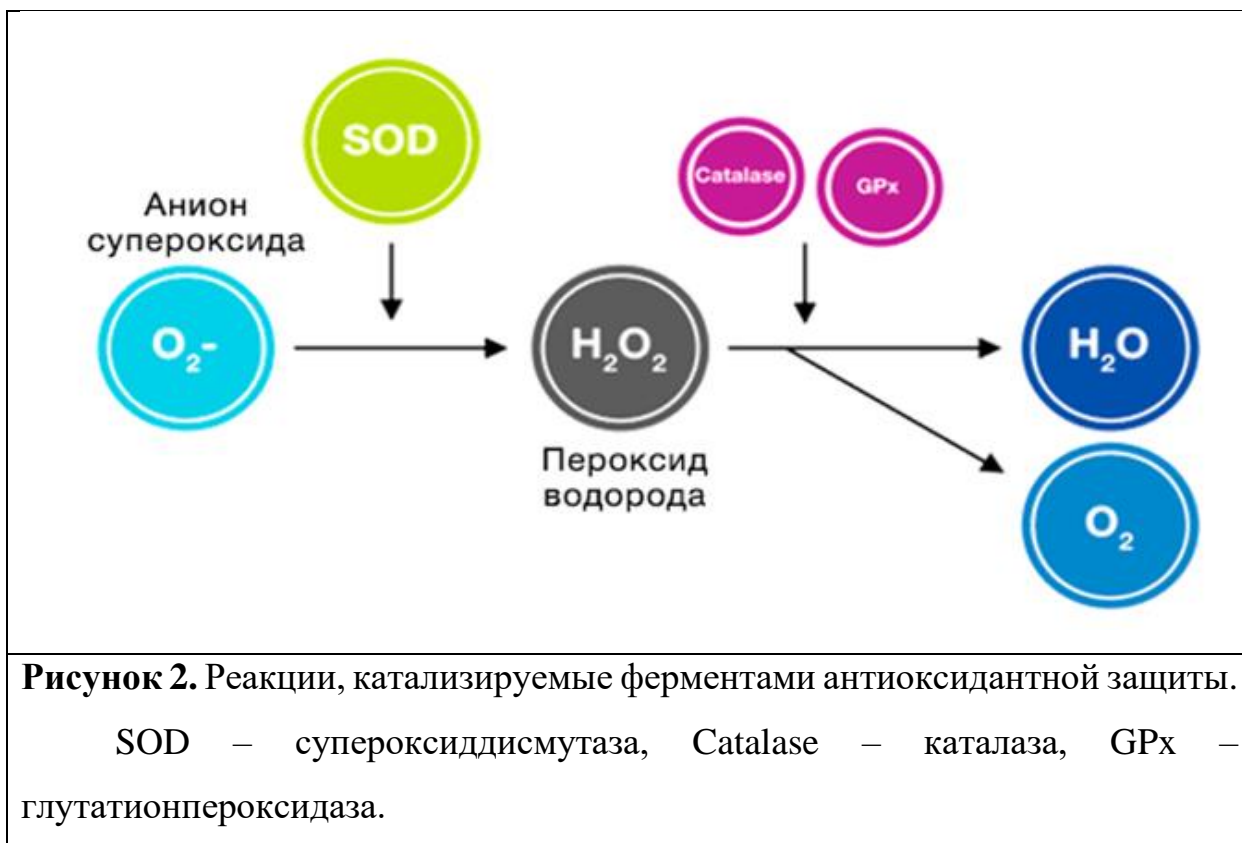
1.4. Ферментативные и неферментативные антиоксидантные системы

Эндогенная антиоксидантная система является основным регулятором содержания АФК в клетке. Она обеспечивает защиту молекул и органелл от окислительного повреждения в норме и патологии. Общая антиоксидантная активность (ОАА) является важным параметром, отражающим способность организма компенсировать избыток свободных радикалов через антиоксидантную систему, уровень метаболизма свободных радикалов в организме и антиоксидантную способность организма [36]. ОАА используется в качестве лабораторного теста у пациентов с высоким сердечно-сосудистым риском для мониторинга течения основного заболевания и оценки эффективности проводимой терапии. Более высокие уровни ОАА в сыворотке связаны с повышенной смертностью у пациентов с ОНМК и могут использоваться в качестве важного прогностического биомаркера [52], хотя для широкого использования в клинической практике необходимо больше доказательств эффективности метода.

Антиоксиданты делят на ферментативные и неферментативные в зависимости от молекулярного строения. Ферментные системы включают супероксиддисмутазу (СОД), тиоредоксин, параоксоназу, глутатионпероксидазу, каталазу, глутатион-S-трансферазу и другие. Неферментные системы включают глутатион, витамин А, витамин С, витамин Е, каротиноиды и другие низкомолекулярные вещества (мочевая кислота, билирубин, некоторые гормоны и др.) [53].

Супероксиддисмутазы – это группа металлоферментов, которые катализируют реакцию дисмутации супероксидных анион-радикалов, посредством чего поддерживают их концентрацию на низком уровне [54]. Образующийся в результате реакции пероксид водорода представляет собой менее реакционноспособную молекулу, которая затем разрушается каталазой

или глутатионпероксидазой с образованием воды (**Рисунок 2**). Изоформы фермента отличаются типом катиона металла, который содержится в активном центре фермента: изоформа СОД1 содержит в активном центре катион двухвалентной меди, а структура молекулы стабилизируется катионом цинка; изоформа СОД2 в активном центре содержит катион двухвалентного марганца. Помимо этого, СОД1 преимущественно представлена в цитоплазме, в то время как СОД2 – в митохондриях.



Каталаза представляет собой тетрамер из четырех полипептидных цепей, содержащий четыре гемовые группы. Основной функцией фермента является катализ реакции разложения пероксида водорода на воду и молекулярный кислород.

Многие исследования, направленные на поиск нейропротекторов, показали высокую эффективность различных антиоксидантов для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний [55-57].

1.5. Связь между окислительным стрессом и запуском апоптоза

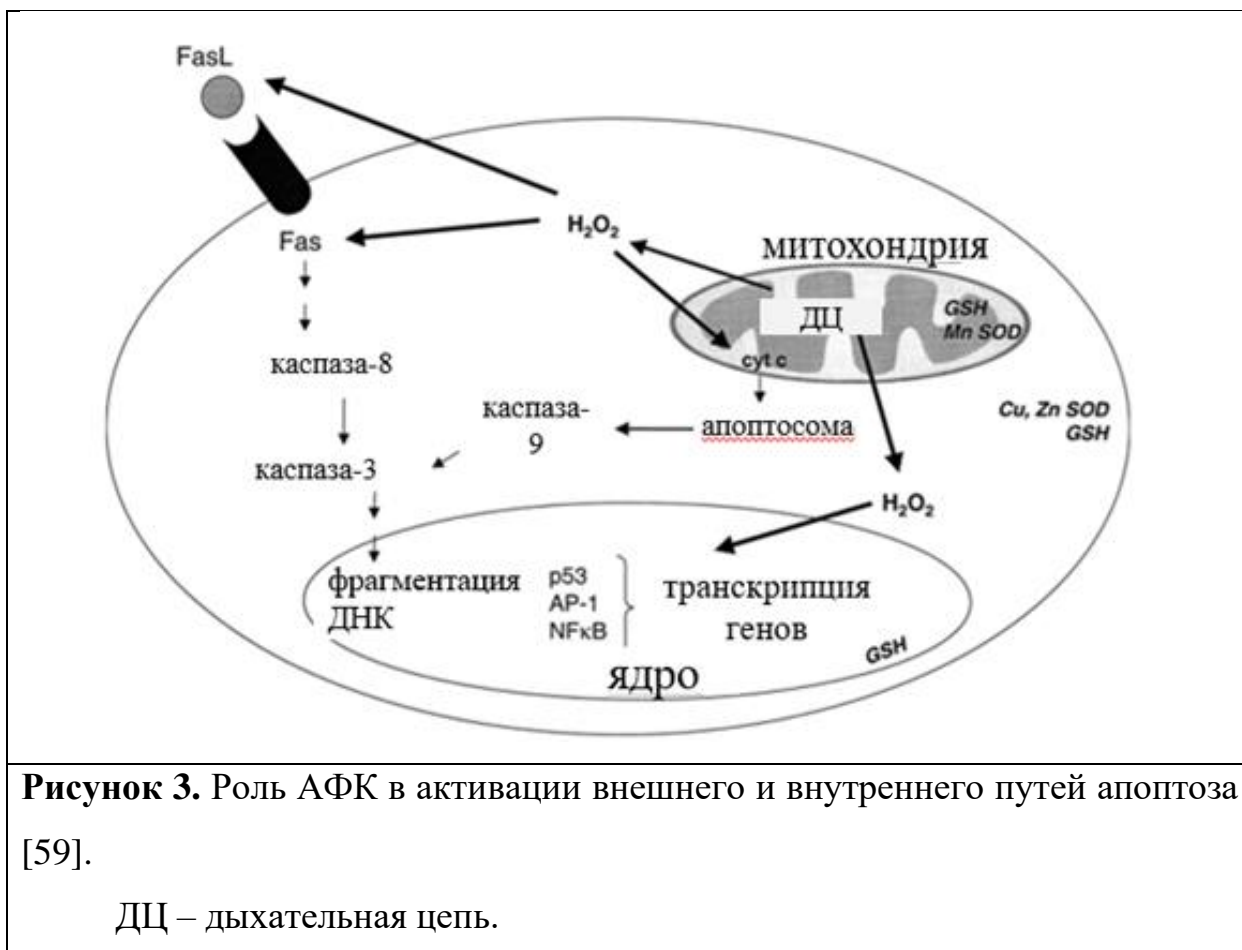
Апоптоз – запрограммированный механизм клеточной смерти – может рассматриваться как более безопасный способ гибели клетки, защиты ткани от избыточного накопления продуктов распада, образующихся при некрозе.

Накопление большого количества АФК в результате патологического процесса приводит к активации апоптоз-индуцирующего фактора и запускает внутренний митохондриальный путь апоптоза. Во внешнюю мембрану митохондрий встраиваются проапоптогенные белки семейства Bcl-2, которые образуют поры и приводят к утечке цитохрома С из межмембранного пространства. Цитохром С, попав в цитозоль, связывается с белком Араф-1 и вместе они формируют апоптосому. Сборка апоптосомного комплекса приводит к запуску каскада каспаз через активацию каспазы-9 [58, 59]. Каспазы приводят к фрагментации ДНК и сборке апоптотических телец.

Альтернативно АФК могут запускать апоптоз через внешний путь посредством взаимодействия с многочисленными рецепторами цитоплазматической мембраны. Наиболее полно в литературе описана активация Fas-рецепторов, относящихся к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухолей. Связывание с лигандом приводит к интернализации рецепторного комплекса, в цитозоле комплекс взаимодействует с каспазой-8 и активирует ее. Последняя, в свою очередь, расщепляет другие эффекторные каспазы и таким образом запускает процесс клеточной гибели [59]. Плотность Fas-рецепторов выше у лиц пожилого возраста [60], что может влиять на количество клеток, гибнущих апоптозом в условиях окислительного стресса.

Наконец, АФК могут напрямую модулировать апоптоз через факторы транскрипции генов клеточной гибели. Показано, что пероксид водорода может напрямую влиять на экспрессию гена р53 и активировать факторы транскрипции Ар-1 и NF-kB, ответственных за экспрессию генов клеточного цикла и апоптоза [59].

Схематически взаимодействие АФК и факторов апоптоза представлено на схеме (**Рисунок 3**).



Связь апоптотических процессов и окислительного стресса подтверждается в том числе и антиоксидантными свойствами некоторых белков апоптоза: белки семейства Bcl-2 участвуют в поглощении избыточного количества АФК в клетке как напрямую, так и путем активации экспрессии генов антиоксидантной системы [61].

1.6. Ишемия-реперфузия в мозге молодых животных

Накопление продуктов ПОЛ в мозге молодых животных начинается уже во время ишемии, но усиленное их образование совпадает по времени с началом реперфузии и продолжается не менее часа [62]. Так, индекс окисленности липидов, свидетельствующий об изменении отношения конъюгированных двойных связей к изолированным двойным связям, достоверно повышается у животных, подвергшихся ИР, по сравнению с контролем [63-65]. Диеновые и триеновые конъюгаты являются первичными продуктами ПОЛ, их содержание в коре головного мозга молодых (3-4 месяца)

крыс увеличивается на 30% и 27% соответственно через час после проведения двухсосудистой ишемии переднего мозга с гипотензией [66].

Малоновый диальдегид (МДА) – один из конечных продуктов перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот в нейронах – также является биохимическим маркером перекисного окисления липидов [67]. 30-минутная ишемия и последующая часовая реперфузия приводит к резкому (в 2 раза) увеличению содержания МДА в коре головного мозга [68].

Повышение содержания АФК приводит к компенсаторной активации антиоксидантной системы. Изолированная ишемия приводит к снижению активности супероксиддисмутазы, а последующая реперфузия – к компенсаторному повышению ее активности до значений, сравнимых с таковым у ложнооперированных животных [65]. Аналогичные данные в литературе получены для фермента каталазы [69, 70]. В то же время часовая реперфузия приводит к достоверному снижению экспрессии генов *sod1* и *sod2*, кодирующих цитозольную и митохондриальную форму супероксиддисмутазы соответственно [71].

Активность фермента Na^+, K^+ -АТФаза является косвенным показателем функционального состояния нейронов, и по данному показателю можно оценивать тяжесть повреждения нервной ткани. Ишемия с последующей реперфузией приводит к достоверному снижению активности фермента, что свидетельствует о нарушении работы нервных клеток вследствие ишемического инсульта [66].

1.7. Ишемия-реперфузия в мозге стареющих животных

Работ, направленных на изучение биохимического ответа нейронов головного мозга старых животных на воздействие ИР, критически мало. Косвенно судить об отличительных чертах реакции стареющего мозга на окислительный стресс можно на основании имеющихся исследований нейропротекторов на моделях со стареющими животными.

Так, вне патологического процесса, содержание диеновых конъюгатов (ДК) достоверно выше во всех отделах мозга стареющих крыс по сравнению с

таковым в мозге молодых животных в 3.5 раза. В то же время интенсивность накопления ДК в коре мозга старых крыс вследствие двухсосудистой окклюзии сонных артерий не так выражена: прирост данного показателя в группе молодых животных составил 300%, в группе старых животных – 45% [72]. Аналогично характеризуется изменение концентрации МДА в нейронах крыс разных возрастных групп [73].

Изменения активности антиоксидантной системы, показанные в различных исследованиях, подтверждают общие данные о ее функционировании в мозге стареющих животных. В нейронах старого мозга более низкое содержание глутатиона и снижена базальная активность каталазы [74], но влияние ишемии на уровень этих показателей сопоставимо с таковым у молодых крыс [72, 75]. Активность СОД снижается под воздействием реперфузионного повреждения, но в старом мозге эти изменения выражены значительно [72, 73].

Реперфузия различной длительности вызывает изменения в интенсивности апоптотических процессов: активность каспазы-3 – одного из ключевых ферментов апоптоза – повышается под воздействием ИР, однако если в молодом мозге этот показатель достигает своего пика в течение суток, то в старом мозге активность каспазы-3 достигает максимума к концу третьих суток реперфузии [72]. Интерпретируя эти данные, можно заключить, что апоптотические процессы менее выражены в стареющем мозге в ответ на ишемическое воздействие. Это может быть опосредовано изначальным биоэнергетическим дефицитом, так как апоптоз – энергетически затратный механизм.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Экспериментальная модель глобальной двухсосудистой ишемии переднего мозга крыс с гипотензией и реперфузией

Все эксперименты проводили в соответствии с правилами, разработанными и утвержденными Этическим комитетом ИЭФБ РАН, и правилами и требованиями, изложенными в документах «European Communities Council Directive 1986» (86/609/EEC) и «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals». В экспериментах использовали самцов крыс линии Wistar в возрасте 22-24 месяцев. Животные содержались в стандартных условиях вивария и без ограничений получали стандартную кормовую смесь и питьевую воду.

Крысы случайным образом были разделены на 4 группы:

1. Ложно-оперированные животные, соответствующие группе ИР-1 (ЛО-1, $n=7$);
2. Животные, перенесшие двухсосудистую ишемию головного мозга с гипотензией и последующей реперфузией в течение 1 ч (ИР-1, $n=7$);
3. Ложно-оперированные животные, соответствующие группе ИР-3 (ЛО-3, $n=7$);
4. Животные, перенесшие двухсосудистую ишемию головного мозга с гипотензией и последующей реперфузией в течение 3 ч (ИР-3, $n=7$).

Перед операцией проводилась анестезия с помощью внутривенной инъекции хлоральгидрата в дозе 400 мг/кг массы тела. Двухсосудистая ишемия переднего мозга вызывалась у крыс путем окклюзии каротидных артерий в сочетании с гипотензией и проводилась в течение 20 мин [76]. В ходе операции проводили препарирование правой бедренной артерии и общих сонных артерий через продольные разрезы в области внутренней поверхности правого бедра и по срединной линии шеи соответственно. Далее бедренная артерия катетеризировалась, и в нее вводили 0.2 мл физиологического раствора, содержащего 10 Ед гепарина. Затем из катетера осуществлялся забор артериальной крови до достижения уровня систолического артериального

давления 50 мм рт. ст. Контроль артериального давления проводили с использованием системы для неинвазивного измерения давления «Систола» («Нейроботикс», Россия). После этого сосудистыми клипсами пережимали общие сонные артерии на 20 мин. Для восстановления мозгового кровообращения и достижения реперфузии переднего мозга снимали сосудистые клипсы и одновременно вводили отобранную ранее кровь в бедренную артерию со скоростью 1-2 мл/мин. Животные находились в состоянии реперфузии в течение 1 или 3 ч в зависимости от экспериментальной группы. Ложнооперированные животные подвергались воздействию общей анестезии, и у них проводилось препарирование сосудов, но не отбиралась кровь и не проводилась окклюзия общих сонных артерий. После завершения реперфузии у крыс выделяли кору головного мозга и гиппокамп и использовали для определения активности Na^+, K^+ -АТФазы, продуктов ПОЛ (ДК, ТК, оснований Шиффа и МДА) и для экстракции тотальной РНК.

2.2. Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени, совмещенная с обратной транскрипцией

2.2.1. Выделение тотальной РНК

Экстракцию РНК из нейронов коры головного мозга крыс проводили посредством фенол-хлороформной реакции и с помощью реагента «Extract RNA» («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. Концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре «NanoPhotometer P300» («IMPLEN», Германия). По данным спектрофотометрии рассчитывали отношение оптической плотности при длинах волн 260 и 280 нм и отношение при длинах 260 и 230 нм. Первое находилось в диапазоне 1.9-2.2, второе было больше 1.8 и свидетельствовало о содержании органических соединений. В случае отклонений от контрольных значений проводили повторную отмывку образцов РНК и измерение концентрации.

2.2.2. Обратная транскрипция, совмещенная с полимеразной цепной реакцией

Предварительно очищенные от ДНК образцы подвергали обратной транскрипции с использованием набора «MMLV-RT kit» («Евроген», Россия) и Random Hexamer Primer в соответствии с инструкцией производителя.

2.2.3. Количественная полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени

Смесь для ПЦР в реальном времени содержала: 10 нг продукта после обратной транскрипции, 0.4 мкМ прямого и обратного праймера и реагента «qPCRmixHS SYBR+LowROX» («Евроген», Россия) – всего в общем объеме 25 мкл. Реакция амплификации и регистрация сигнала производилась с использованием аппарата «7500 Real-Time PCR System» («Thermo Fisher Scientific», США).

ПЦР реакция производилась в следующей последовательности:

- 1) реакция денатурации при 95°C в течение 5 мин;
- 2) 38 циклов амплификации по 30 с при температуре 95°C, отжиг праймеров при температуре, указанной в Таблице 1, в течение 10 с, элонгация продолжительностью 30 с при 72°C;
- 3) кривая плавления: 95°C в течение 15 с, 60°C в течение 1 мин, разогрев образца до 95°C с детекцией каждые 1% времени нагрева, выдерживание в течение 30 с, охлаждение до 60°C в течение 15 с. Полученные кривые плавления анализировали на предмет наличия димеров и двойных пиков с целью исключения таких образцов.

Контроль размера полученного ампликона производили путем электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Последовательности использованных олигонуклеотидных праймеров приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Характеристика олигонуклеотидных праймеров.

Ген	Последовательности прямого (For) и обратного (Rev) праймеров	Темп. отжига, °C	Номер по Gene Bank
<i>Bax</i>	For: TAGCAAACCTGGTGCTCAAGG	56	NM_017059.2

	Rev: TCTTGGATCCAGACAAGCAG		
<i>Bcl-2</i>	For: TAGCAAACCTGGTGCTCAAGG	57	NM_016993.1
	Rev: TCTTGGATCCAGACAAGCAG		
<i>Sod1</i>	For: AATGTGTCCATTGAAGATCGTGTGA	56	NM_017050.1
	Rev: GCTTCCAGCATTTCCAGTCTTTGTA		
<i>Sod2</i>	For: GTGGGAGTCCAAGGTTTCAGG	57	NM_017051.2
	Rev: TAAGGCCTGTGGTTCCTTGC		
<i>Cat</i>	For: TTATGTTACCTCACAGCCTGGT	56	NM_012520.2
	Rev: GTGTTGTGTGTTCTGTGTGTGTAG		
<i>nNos</i>	For: AGTCCCCTGCTTCGTGAGA	56	NM_052799.1
	Rev: CACCCGAAGACCAGAACCAT		
<i>Atpa2</i>	For: GGTGGCCCTCCGAATG TAC	57	NM_012505.2
	Rev: ATGAAGATGAGGAGACTGTAGGGAAA		
<i>Atpa3</i>	For: CCATTGTCACTGGTGTGGAG	57	NM_012506.1
	Rev: CAATGCAGAGGATGGTGATG		
<i>18S RNA</i>	For: GGACACGGACAGGATTGACA	56	NM_046237.1
	Rev: ACCCACGGAATCGAGAAAGA		

2.2.4. Анализ данных полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени

Анализ полученных данных производился с применением программного обеспечения 7500 Software v 2.0.6. и ExpressionSuite Software v1.0.3 («Thermo Fisher Scientific», США). Уровень экспрессии целевого гена рассчитывался по следующим формулам:

$\Delta CT = CT_{\text{целевой ген}} - CT_{\text{эндогенный контроль}}$;

$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{образец}} - \Delta CT_{\text{контроль}}$;

$RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$, где CT – значение порогового цикла (cycle threshold), на котором увеличение ΔRn максимально, а RQ – относительные единицы уровня мРНК целевого гена. За эндогенный контроль брали экспрессию гена 18S.

2.3. Изучение уровня продуктов перекисного окисления липидов

2.3.1. Выделение липидов из тканей головного мозга

Выделение липидов из коры головного мозга старых крыс производили по методу J. Folch [77]. После декапитации извлекали головной мозг, очищали его от соединительнотканых структур и кровеносных сосудов и с помощью пинцета отделяли кору от подлежащего белого вещества. Выделенную ткань гомогенизировали в смеси хлороформа и метанола (отношение 2:1) из расчета 20 частей экстрагирующей смеси на одну часть ткани и в течение получаса проводили экстракцию липидов.

Затем образцы проводили через бумажный фильтр и измеряли объем полученного фильтрата. Для растворения нелипидных водорастворимых компонентов к фильтрату добавляли раствор NaCl 0.1% в объеме 0.2 мл от объема образца и перемешивали. Затем раствор центрифугировали 15 мин при 3000 g с целью разделения на фазы. Водно-метанольную фазу (верхнюю) удаляли с помощью пипетки. К нижней хлороформ-содержащей фазе приливали метанол по каплям до образования прозрачного раствора. После липидный экстракт высушивали и определяли его массу.

Полученный экстракт использовали для определения количества общих липидов, уровня ДК и ТК, содержания оснований Шиффа и расчета индекса окисленности.

2.3.2. Метод количественного определения диеновых и триеновых конъюгатов

Метод основан на установлении содержания продуктов ПОЛ в коре головного мозга по поглощению двойными связями липидного экстракта монохроматического светового потока в ультрафиолетовой области спектра с образованием характерных пиков [78]. Липидный экстракт в объеме 0.25 мл высушивали на испарителе и растворяли в 4 мл смеси метанол-гексан (5:1). Замер оптической плотности осуществляли на спектрофотометре «UV-2401» («Shimadzu», Япония) при длине волны 232 нм (максимум поглощения для ДК) и 274 нм (максимум поглощения для ТК). Для расчета индекса окисленности липидов проводили фотометрирование при длине волны 215 нм. Количество ДК и ТК выражали в условных единицах на 1 мг общих липидов.

Индекс окисленности липидов рассчитывали как отношение между оптическими плотностями OD232/OD215.

2.3.3. Метод количественного определения оснований Шиффа

Метод основан на установлении содержания продуктов ПОЛ по поглощению липидным экстрактом монохроматического светового потока в ультрафиолетовой области спектра. Из экстракта выпаривали растворитель, осадок растворяли в 5 мл хлороформа. Затем проводили регистрацию флюоресценции на флуориметре «RF-1501» («Shimadzu», Япония) при максимуме возбуждения при длине волны 340-360 нм и максимуме испускания в области длин волн 440-450 нм. Содержание оснований Шиффа выражали в условных единицах из расчета на 1 мг общих липидов.

2.3.4. Метод определения содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой

Метод основан на образовании окрашенного комплекса ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) при взаимодействии МДА с тиобарбитуровой кислотой в кислой среде при температуре 90-100°C и определении концентрации ТБК-АП [79].

Кору головного мозга подвергали гомогенизации в буфере 30 мМ Трис-НСl, 100 мМ KCl, pH 7.4 из расчета 5 мл буфера на 1 г ткани. К 500 мкл гомогената добавляли 1%-ный раствор H_3PO_4 из расчета 1 часть ортофосфорной кислоты к 1 части гомогената. К полученной смеси доливали 1 мл 0.5%-ного раствора тиобарбитуровой кислоты. Затем пробы подвергали последовательному нагреванию в течение 20 минут, охлаждению до комнатной температуры и центрифугированию при 3000 g в течение 10 минут. Полученный супернатант фотометрировали при 535 нм и 600 нм спектрофотометре «UV-2401» («Shimadzu», Япония). Определение концентрации белка осуществлялось по методу Лоури. Содержание малонового диальдегида оценивали с использованием молярного коэффициента экстинкции ($1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и выражали в нмоль ТБК-АП на 1 мг белка.

2.4. Определение активности Na^+, K^+ -АТФазы

Активность Na^+, K^+ -АТФазы, выделенной из грубой синаптосомальной фракции коры головного мозга стареющих крыс, определяли по сопряженной реакции в присутствии избытка пируваткиназы, лактатдегидрогеназы и фосфоэнолпирувата при регистрации убыли НАДН в среде инкубации [80]. Далее проводили инкубацию суспензии в 10 мкл среды следующего состава: 40 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 137 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 2 мМ MgCl_2 , 0.4 мМ НАДН, 1мМ ЭГТА, 1мМ NaN_3 , 1 мМ АТФ, 2 мМ фосфоэнолпируват, 5 Ед/мл пируваткиназа, 4 Ед/мл лактатдегидрогеназа, 0.01% дигитонин, 17 мкг/мл ротенон. Затем определяли суммарную активность и активность Mg^{2+} -АТФазы, последнюю измеряли в присутствии строфантина G. Разница этих показателей представляет собой активность Na^+, K^+ -АТФазы. Активность фермента измеряли на спектрофотометре «Specord M-40» («Analytik Jena», Германия) и выражали в микромолях неорганического фосфата (Фн)/мг белка/час. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Лоури.

2.5. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в программе «Microsoft Office Excel 2015» с помощью надстройки «AtteStat» и программы «RStudio». Данные представлены в виде $M \pm SD$ (как среднее \pm стандартное отклонение). Выборки проверяли на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения группы сравнивали по t-критерию Стьюдента для двух независимых выборок. Для сравнения трех и более групп применяли дисперсионный анализ с поправкой Тьюки на множественные сравнения.

В случае неудовлетворения распределения данных в выборках критериям нормальности, их обрабатывали с помощью непараметрических методов статистического анализа: две независимые группы сравнивали по критерию Манна-Уитни, три и более групп – тестом Крускала-Уоллеса с последующим попарным сравнением. Статистически значимыми считались отличия при уровне значимости $p < 0.05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ.

3.1. Изучение влияния ишемии и реперфузии различной длительности на активность Na^+, K^+ -АТФазы и экспрессию ее субъединиц в коре головного мозга старых крыс.

Na^+, K^+ -АТФаза – мембранный транспортер, основной функцией которого является создание ионного градиента. Функциональная единица фермента состоит из двух полипептидных цепей: большей (α -субъединицы) и меньшей (β -субъединицы) (**Рисунок 4**). Меньшая субъединица пересекает мембрану один раз, а большая образует несколько петель, при этом оба конца пептидной цепи обращены в цитозоль [81]. В процессе белкового синтеза обе субъединицы встраиваются в мембрану одновременно.

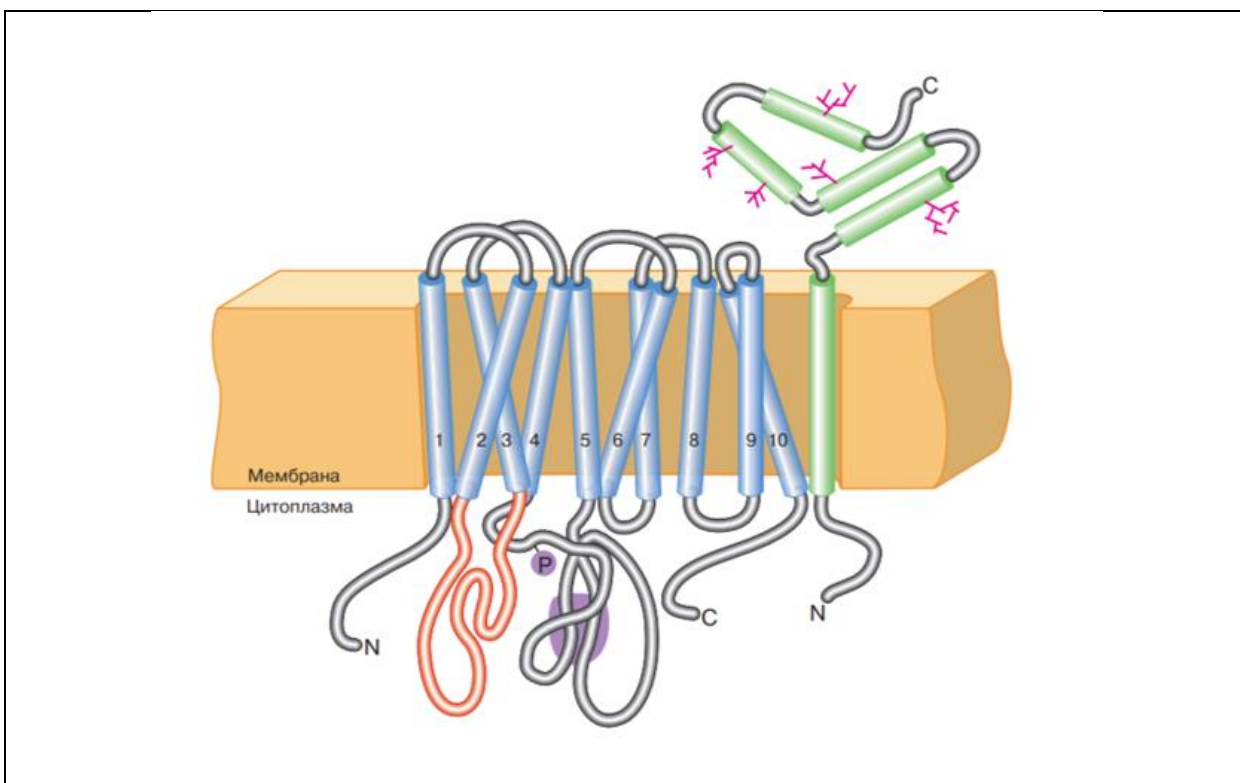


Рисунок 4. Структура Na^+, K^+ -АТФазы [81].

α -субъединица окрашена голубым, β -субъединица – зеленым цветом. N- и C-концы полипептидных цепей обозначены соответствующими буквами.

Субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы существуют в нескольких изоформах, по-разному распределенных в тканях. Так, в головном мозге преобладает экспрессия каталитических $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -субъединиц [82].

Этот фермент широко представлен в нервной системе, и его активность можно считать косвенным показателем функционального состояния клетки. Na^+, K^+ -АТФазы – главный потребитель энергии в нервной ткани, на ее работу затрачивается порядка половины всей синтезируемой в клетке АТФ [83], что делает фермент зависимым от дефицита энергетического субстрата. Свободные радикалы являются основным повреждающим агентом в процессе постишемического повреждения [84]. Накопление АФК в клетке приводит к окислительной деградации ферментов и снижению их активности, патологическому воздействию подвергается и Na^+, K^+ -АТФаза.

Двухсосудистая ишемия головного мозга старых крыс привела к достоверному снижению активности Na^+, K^+ -АТФазы через 3 ч после начала реперфузии на 18.9% – с 27.1 ± 1.4 до 21.9 ± 0.7 мкмоль Фн/мг белка/ч, $p < 0.05$ – по сравнению с ложнооперированным контролем и на 9.8%, $p < 0.05$ по сравнению с животными, подвергнутыми одночасовой реперфузии (**Рисунок 5**). Реперфузия в течение одного часа не привела к значимым изменениям активности фермента по сравнению с контролем.

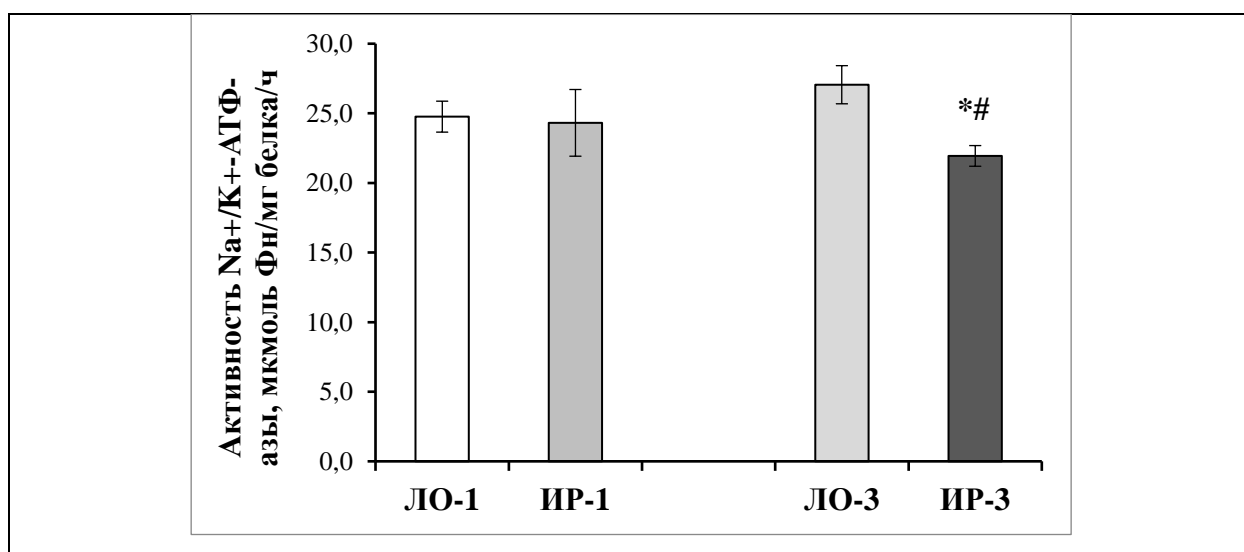


Рисунок 5. Влияние ишемии и реперфузии различной продолжительности на активность Na^+, K^+ -АТФазы в коре мозга стареющих крыс.

ИР-1 – крысы, подвергнутые ишемии и часовой реперфузии, ИР-3 – крысы, подвергнутые ишемии и трехчасовой реперфузии, ЛО-1 и ЛО-3 – ложнооперированные крысы, соответствующие экспериментальным группам. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=7$). Различия: * – статистически значимые отличия от соответствующего контроля, $p < 0.05$; # – статистически значимые отличия от группы ИР-1, $p < 0.05$.

С помощью ПЦР в реальном времени было показано, что ишемия-реперфузия приводит к изменению экспрессии обеих исследованных субъединиц Na^+, K^+ -АТФазы (**Рисунок 6**). Реперфузия в течение одного часа приводила к достоверному снижению экспрессии генов *Atpa2* и *Atpa3*, а продление реперфузии – к восстановлению экспрессии до контрольного уровня, причем экспрессия в группе ИР-3 была значительно выше таковой в группе ИР-1.

Снижение активности Na^+, K^+ -АТФазы и экспрессии ее субъединиц может быть напрямую связано с окислительной инактивацией как самой Na^+, K^+ -АТФазы, так и ферментов, ответственных за синтез белка. Увеличение экспрессии $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -субъединиц Na^+, K^+ -АТФазы совпадает по времени со снижением активности фермента и может рассматриваться в качестве механизма компенсации.

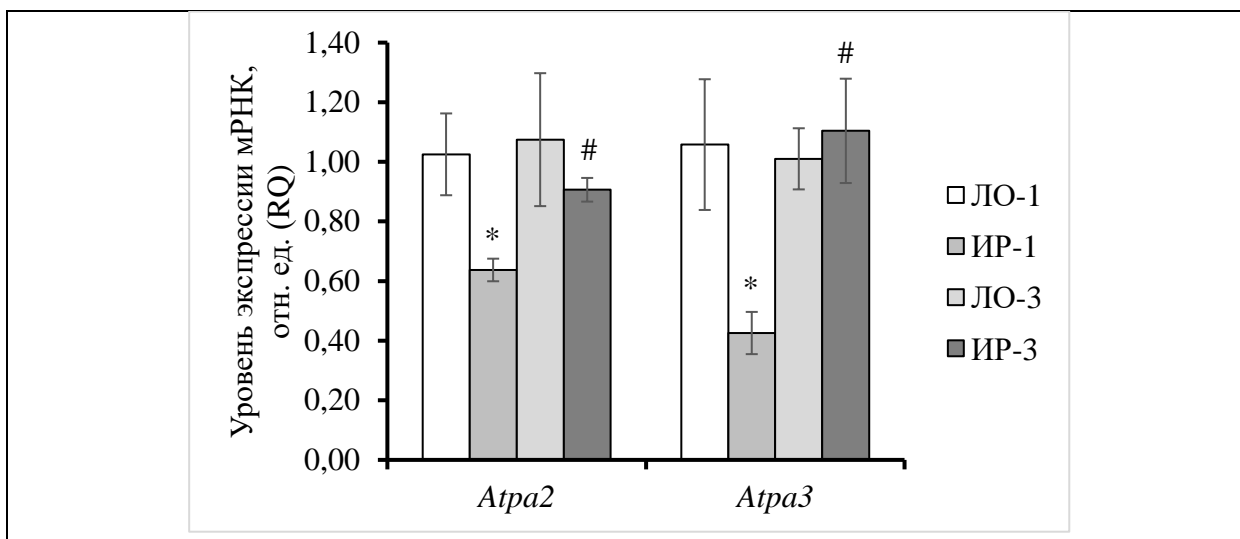


Рисунок 6. Влияние ИР на экспрессию генов каталитических $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -субъединиц Na^+, K^+ -АТФазы (*Atpa2*, *Atpa3*) в коре мозга стареющих крыс.

ИР-1 – крысы, подвергнутые ишемии и часовой реперфузии, ИР-3 – крысы, подвергнутые ишемии и трехчасовой реперфузии, ЛО-1 и ЛО-3 – ложнооперированные крысы, соответствующие экспериментальным группам. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=7$). Различия: * – статистически значимые отличия от соответствующего контроля, $p < 0.05$; # – статистически значимые отличия от группы ИР-1, $p < 0.05$.

3.2. Изучение влияния ишемии и реперфузии различной продолжительности на накопление продуктов перекисного окисления липидов в коре головного мозга старых крыс.

Ишемия с последующей однократовой реперфузией не приводила к достоверным изменениям в содержании продуктов ПОЛ в мозге стареющих крыс. Однако в группе с трехчасовой реперфузией выявлен достоверно более высокий уровень триеновых конъюгатов (на 19%) и оснований Шиффа (на 75%) по сравнению с контрольной группой (**Таблица 2**). Аналогично индекс окисленности липидов оказался значительно выше в группе ИР-3 (на 12%) по сравнению с соответствующим контролем. Для таких показателей, как уровень МДА и содержание диеновых конъюгатов значительных различий между экспериментальными группами выявлено не было.

Таблица 2. Влияние ишемии и реперфузии различной длительности на содержание продуктов перекисного окисления липидов в мозге стареющих крыс.

	ЛО-1	ИР-1	ЛО-3	ИР-3
Диеновые конъюгаты, усл. ед./мг липидов	57.9±3.9	58.4±3.0	54.8±3.8	63.5±6.9
Триеновые конъюгаты, усл. ед./мг липидов	13.6±0.2	13.9±1.1	12.9±0.8	15.4±0.9 *#
Индекс окисленности липидов	0.154±0.004	0.160±0.008	0.156±0.005	0.175±0.003 *#
Основания Шиффа, усл. ед./мг липидов	0.154±0.018	0.185±0.031	0.194±0.027	0.341±0.076 *#
МДА, нмоль/мг белка	0.163±0.004	0.173±0.006	0.180±0.027	0.201±0.041

Примечание: ИР-1 – крысы, подвергнутые ишемии и часовой реперфузии, ИР-3 – крысы, подвергнутые ишемии и трехчасовой реперфузии, ЛО-1 и ЛО-3 – ложнооперированные крысы, соответствующие экспериментальным группам. Данные представлены как $M \pm SD$ (n=7). Различия достоверны: * - статистически значимые отличия от соответствующего контроля, $p < 0.05$; # - статистически значимые отличия от группы ИР-1, $p < 0.05$.

Таким образом, накопление некоторых продуктов ПОЛ становится выражено только спустя три часа после начала реперфузии, а для оставшихся показателей значимых изменений не было выявлено совсем. В молодом мозге накопление изученных нами биомаркеров окислительного повреждения происходит уже на ранних этапах реперфузии и выражено гораздо сильнее. Эти данные могут свидетельствовать о меньшей интенсивности окислительных процессов в стареющем мозге в ответ на реперфузионное повреждение как его отличительную особенность.

3.3. Изучение влияния ишемии и реперфузии различной длительности на интенсивность апоптотических процессов в мозге стареющих крыс.

Экспрессия гена *Bax*, кодирующего одноименный проапоптотический белок достоверно снижалась через 1 ч после начала реперфузии, а продление реперфузии до 3 ч приводило к возвращению уровня экспрессии к таковому в контрольной группе (**Рисунок 7**). Аналогичная динамика прослеживалась и для экспрессии гена *Bcl-2*, кодирующего антиапоптотический белок BCL-2, причем через 3 часа экспрессия этого гена значимо превышала таковую у соответствующего контроля. Соотношение *Bax/Bcl-2*, характеризующее проапоптотический потенциал клетки, через 3 часа после реперфузии имело тенденцию к снижению, но различия с контролем не были статистически значимы.

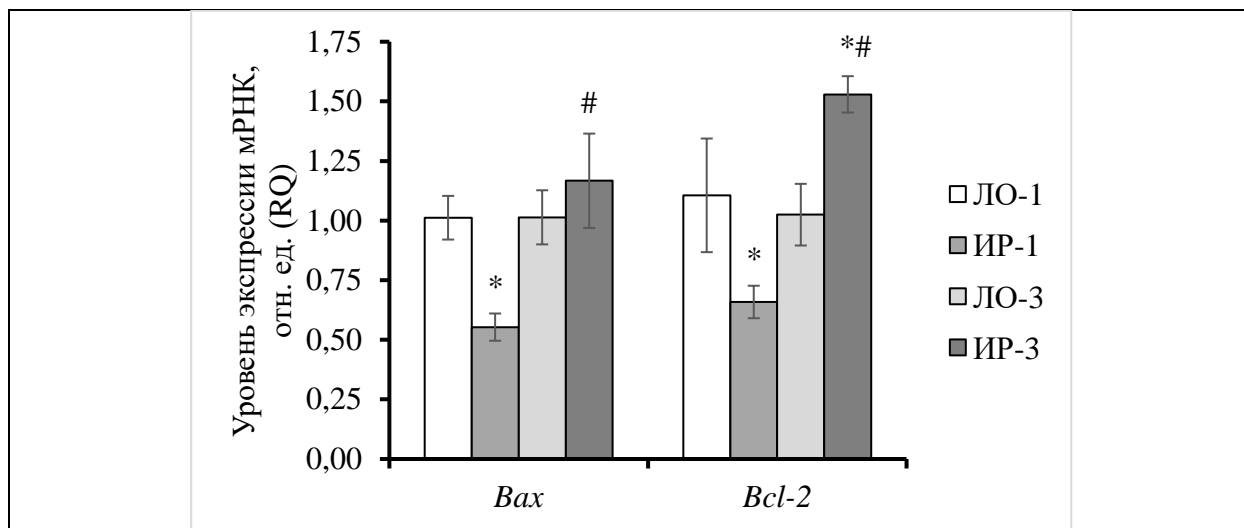


Рисунок 7. Изменение экспрессии генов про- и антиапоптотических белков *Bax* и *Bcl-2* в коре головного мозга стареющих крыс при двухсосудистой ишемии переднего мозга и реперфузии различной длительности.

ИР-1 – крысы, подвергнутые ишемии и часовой реперфузии, ИР-3 – крысы, подвергнутые ишемии и трехчасовой реперфузии, ЛО-1 и ЛО-3 – ложнооперированные крысы, соответствующие экспериментальным группам. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=7$). Различия: * - статистически значимые отличия от соответствующего контроля, $p < 0.05$; # - статистически значимые отличия от группы ИР-1, $p < 0.05$.

Выявленные изменения могут характеризовать интенсивность апоптотических процессов в стареющем мозге. Снижение экспрессии обоих маркеров через час после индукции реперфузии может быть обосновано замедлением синтетических процессов в клетке вследствие окислительного повреждения. Через 3 ч реперфузии экспрессия гена *Bax* увеличивается, и это согласуется с показанной ранее более поздней активацией апоптоза по сравнению с развитием окислительного повреждения [85]. Значимое по сравнению с контролем усиление экспрессии гена *Bcl-2* может свидетельствовать о компенсаторном повышении антиапоптотического потенциала через 3 ч после ишемического повреждения.

Также усиленная экспрессия гена *Bcl-2* может быть направлена на реализацию его антиоксидантного потенциала и утилизацию избыточного количества АФК в клетке.

3.4. Изучение экспрессии генов, кодирующих белки антиоксидантной системы, в условиях ишемии и реперфузии различной продолжительности в мозге стареющих крыс.

Реперфузия длительностью 1 ч привела к достоверному снижению экспрессии обеих изоформ СОД, что согласуется с общей тенденцией к снижению синтетических процессов в нейронах в начальном периоде реперфузии (**Рисунок 8**). К третьему часу после восстановления мозгового кровотока экспрессия генов *Sod1* и *Sod2* значительно повысилась, и достигла контрольных значений для гена *Sod2*. Экспрессия гена *Sod1* в группе ИР-3 в 1.7 раз превышает таковую в контрольной группе.

Такое значительное увеличение экспрессии генов СОД может быть компенсаторной реакцией, направленной на снижение концентрации АФК в клетке.

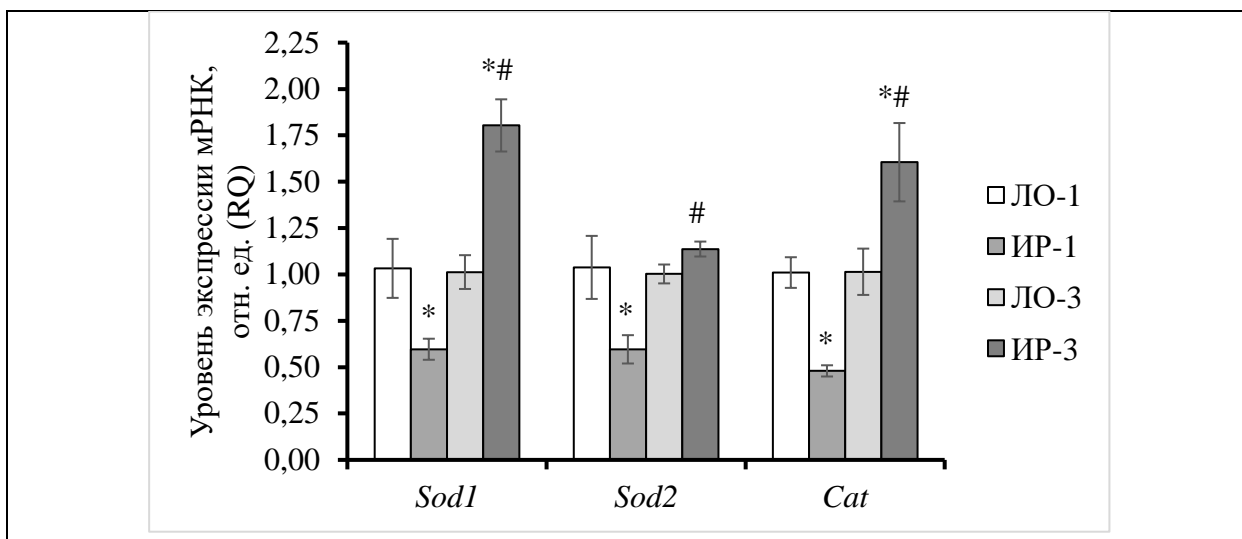


Рисунок 8. Влияние ишемии и реперфузии различной длительности на экспрессию генов супероксиддисмутазы 1-го и 2-го типа (*Sod1*, *Sod2*) и гена каталазы (*Cat*) в коре мозга стареющих крыс.

ИР-1 – крысы, подвергнутые ишемии и часовой реперфузии, ИР-3 – крысы, подвергнутые ишемии и трехчасовой реперфузии, ЛО-1 и ЛО-3 – ложнооперированные крысы, соответствующие экспериментальным группам. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=7$). Различия: * – статистически значимые отличия от соответствующего контроля, $p < 0.05$; # – статистически значимые отличия от группы ИР-1, $p < 0.05$.

Ишемия и однократная реперфузия приводили к значительному снижению экспрессии гена *Cat*, кодирующего каталазу. Продление реперфузии до трех часов способствовало резкому усилению экспрессии гена этого фермента, которая значительно превышала ее значения в контроле (**Рисунок 8**).

Таким образом, выявленные изменения позволяют судить о выраженности антиоксидантного ответа клетки на повреждение, вызванное окислительным стрессом. Через час реперфузии интенсивность экспрессии генов, кодирующих СОД1, СОД2 и каталазу, достоверно снижалась, вероятно, в ответ на окислительное повреждение. Дальнейшее повышение экспрессии, значительно превышающее контрольные уровни, может свидетельствовать об

интенсификации антиоксидантного ответа клетки, как молекулярного механизма ее адаптации к патологическим условиям.

3.5. Исследование изменения экспрессии гена нейрональной NO-синтазы в ответ на ишемию-реперфузию в стареющем мозге.

Нейрональная NO-синтаза является одной из конститутивных форм этого фермента, она представлена в мозге практически во всех его отделах. Оксид азота, продуцируемый этим ферментом, выполняет множество функций в мозге: выступает в качестве нейротрансмиттера, обеспечивает синаптическую пластичность, регулирует тонус мозговых сосудов [86]. В то время как небольшие концентрации NO являются неотъемлемой частью нормального функционирования мозга, избыток этого весьма реакционноспособного соединения опосредует нейротоксичность в патологических ситуациях, в том числе, при ишемическом инсульте [87-89].

NO является активной формой азота, и в условиях патологии становится источником аниона пероксинитрита ONOO^- при взаимодействии с пероксидом водорода. Пероксинитрит – сильный окислитель, и приводит к нитрозилированию белков и биомолекул, в том числе повреждению ДНК. Его действие усугубляет течение окислительного стресса, в том числе посредством ингибирования ферментов антиоксидантной системы [90].

Экспрессия гена *nNos*, кодирующего нейрональную изоформу NO-синтазы, достоверно снижалась через 1 ч после начала реперфузии и значительно повышалась через 3 ч, причем экспрессия исследуемого гена в группе ИР-3 превышала таковой показатель в контрольной группе в 2.7 раз (Рисунок 9).

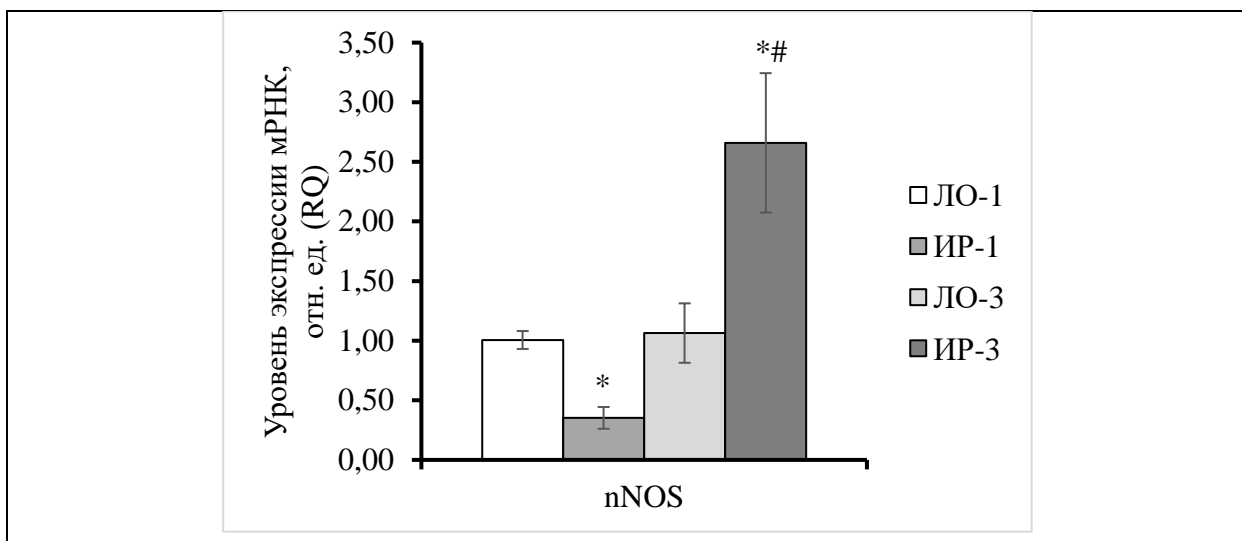


Рисунок 9. Влияние ишемии и реперфузии различной длительности на экспрессию гена нейрональной NO-синтазы (*nNOS*) в коре мозга стареющих крыс.

ИР-1 – крысы, подвергнутые ишемии и часовой реперфузии, ИР-3 – крысы, подвергнутые ишемии и трехчасовой реперфузии, ЛО-1 и ЛО-3 – ложнооперированные крысы, соответствующие экспериментальным группам. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=7$). Различия: * – статистически значимые отличия от соответствующего контроля, $p < 0.05$; # – статистически значимые отличия от группы ИР-1, $p < 0.05$.

Активация нейрональной NO-синтазы, согласно данным литературы, может носить двоякий характер [91]. Так, она может быть опосредована глутаматной эксайтотоксичностью: ишемия головного мозга приводит к повышению внеклеточной концентрации аминокислот глутамата и аспартата, которые стимулируют экспрессию гена *nNos*. В то же время увеличенная продукция оксида азота может быть направлена на снижение тонуса мозговых сосудов и соответствующее усиление притока крови к пораженным областям головного мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами впервые показано, что двухсосудистая ишемия и реперфузия в стареющем мозге вызывает отсроченное накопление продуктов ПОЛ и более позднее по сравнению с молодыми животными снижение активности фермента Na^+, K^+ -АТФазы.

Продление реперфузии приводит к более выраженной активации системы антиоксидантной защиты, чем в случае сходных экспериментов на молодых животных.

Снижение интенсивности большинства процессов, присущее старому мозгу, может рассматриваться и как недостаток, и как преимущество: с одной стороны, ограниченная активность большинства ферментов, в том числе катализирующих окислительно-восстановительные реакции, снижающие уровень АФК и активных форм азота, может способствовать меньшей интенсивности окислительных процессов в нейронах вследствие ишемического повреждения. С другой стороны, сниженные возможности к нейропластичности ограничивают способность мозга восстанавливать функцию после инсульта.

ВЫВОДЫ

1. Впервые установлено, что двухсосудистая ишемия мозга с последующей реперфузией (ИР) у стареющих крыс характеризуется более медленной динамикой развития окислительного стресса в нейронах головного мозга в сравнении с таковой у молодых животных. В отличие от молодых крыс, только спустя 3 ч после восстановления мозгового кровотока у стареющих животных отмечается накопление продуктов перекисного окисления липидов – триеновых конъюгатов и оснований Шиффа, и снижается активность Na^+, K^+ -АТФазы, в то время как через 1 ч эти изменения выражены слабо. Экспрессия генов $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -субъединиц Na^+, K^+ -АТФазы снижается через 1 ч после реперфузии, предвзя снижение активности фермента через 3 ч.

2. Впервые показано, что через 3 ч после реперфузии окислительный стресс в мозге стареющих крыс повышает экспрессию проапоптотического фактора Вах, индуцирующего апоптоз, но при этом повышает экспрессию генов, кодирующих антиапоптотический фактор Bcl-2 и ферменты антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы 1-го и 2-го типов и каталазу, что можно рассматривать, как адаптационный механизм, повышающий выживаемость нейронов при ИР.

3. В нейронах головного мозга стареющих крыс с ИР впервые показана гиперактивация экспрессии гена нейрональной изоформы NO-синтазы, что может быть адаптационным механизмом, направленным на улучшение нейротрансмиссии и восстановление тонуса церебральных микрососудов, и, одновременно с этим, может приводить к нейротоксичности и активации апоптоза.

4. Таким образом, в нейронах головного мозга у стареющих крыс ИР вызывает комплекс биохимических изменений, отличных от таковых у молодых животных, что необходимо учитывать при моделировании ишемических повреждений головного мозга у грызунов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 18-315-00285) и частично при поддержке государственного задания ФАНО России (тема № АААА-А18-118012290427-7).

Автор выражает благодарность Головановой Наталье Эриковне, кандидату биологических наук, доценту кафедры физиологии медицинского факультета СПбГУ и Шпакову Александру Олеговичу, доктору биологических наук, заведующему лабораторией молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН за научное руководство при написании данной работы, а также Зориной Инне Игоревне, наставнику и коллеге на творческом пути в науке.

Также автор благодарит Ассоциацию Выпускников СПбГУ за поддержку во время написания выпускной квалификационной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krishnamurthi R. V., Ikeda T., Feigin V. L. Global, Regional and Country-Specific Burden of Ischaemic Stroke, Intracerebral Haemorrhage and Subarachnoid Haemorrhage: A Systematic Analysis of the Global Burden of Disease Study 2017 // *Neuroepidemiology*. – 2020. – Т. 54, № 2. – С. 171-179.
2. Devleesschauwer B., Havelaar A. H., Maertens de Noordhout C., Haagsma J. A., Praet N., Dorny P., Duchateau L., Torgerson P. R., Van Oyen H., Speybroeck N. Calculating disability-adjusted life years to quantify burden of disease // *Int J Public Health*. – 2014. – Т. 59, № 3. – С. 565-9.
3. Diseases G. B. D., Injuries C. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 // *Lancet*. – 2020. – Т. 396, № 10258. – С. 1204-1222.
4. Gorelick P. B. The global burden of stroke: persistent and disabling // *Lancet Neurol*. – 2019. – Т. 18, № 5. – С. 417-418.
5. Рамонов А. В. Система интегральных индикаторов здоровья населения: методология анализа и возможности применения в России; Национальный исследовательский университет "Высшая школа экономики", 2013.
6. Ovbiagele B., Nguyen-Huynh M. N. Stroke epidemiology: advancing our understanding of disease mechanism and therapy // *Neurotherapeutics*. – 2011. – Т. 8, № 3. – С. 319-29.
7. Centers for Disease C., Prevention. Trends in aging--United States and worldwide // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. – 2003. – Т. 52, № 6. – С. 101-4, 106.
8. Федорова Т. Н. Окислительный стресс и защита головного мозга от ишемического повреждения // Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. – 2004.
9. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // *Physiol Rev*. – 1999. – Т. 79, № 4. – С. 1431-568.
10. Carden D. L., Granger D. N. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury // *J Pathol*. – 2000. – Т. 190, № 3. – С. 255-66.

11. Grace P. A. Ischaemia-reperfusion injury // *Br J Surg.* – 1994. – Т. 81, № 5. – С. 637-47.
12. Flaherty J. T., Weisfeldt M. L. Reperfusion injury // *Free Radic Biol Med.* – 1988. – Т. 5, № 5-6. – С. 409-19.
13. Wu M. Y., Yiang G. T., Liao W. T., Tsai A. P., Cheng Y. L., Cheng P. W., Li C. Y., Li C. J. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury // *Cell Physiol Biochem.* – 2018. – Т. 46, № 4. – С. 1650-1667.
14. Zimmerman B. J., Granger D. N. Reperfusion injury // *Surg Clin North Am.* – 1992. – Т. 72, № 1. – С. 65-83.
15. Singh A., Kukreti R., Saso L., Kukreti S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases // *Molecules.* – 2019. – Т. 24, № 8.
16. Jin K. Modern Biological Theories of Aging // *Aging Dis.* – 2010. – Т. 1, № 2. – С. 72-74.
17. Молекулярные и физиологические механизмы старения. / Анисимов В. Н.: Наука, 2008. – Т. 1.
18. Дильман В. М. Четыре модели медицины // Л.: Медицина. – 1987. – Т. 175. – С. 4.
19. Wisniewski H. M., Terry R. D. Morphology of the aging brain, human and animal // *Prog Brain Res.* – 1973. – Т. 40, № 0. – С. 167-86.
20. Bertoni-Freddari C., Meier-Ruge W., Ulrich J. Quantitative morphology of synaptic plasticity in the aging brain // *Scanning Microsc.* – 1988. – Т. 2, № 2. – С. 1027-34.
21. Fjell A. M., Walhovd K. B. Structural brain changes in aging: courses, causes and cognitive consequences // *Rev Neurosci.* – 2010. – Т. 21, № 3. – С. 187-221.
22. Daniele S., Giacomelli C., Martini C. Brain ageing and neurodegenerative disease: The role of cellular waste management // *Biochem Pharmacol.* – 2018. – Т. 158. – С. 207-216.
23. Daniele S., Pietrobono D., Fusi J., Iofrida C., Chico L., Petrozzi L., Gerfo A. L., Baldacci F., Galetta F., Siciliano G., Bonuccelli U., Santoro G., Trincavelli M. L., Franzoni F., Martini C. alpha-Synuclein Aggregates with beta-Amyloid or Tau in

Human Red Blood Cells: Correlation with Antioxidant Capability and Physical Exercise in Human Healthy Subjects // *Mol Neurobiol.* – 2018. – T. 55, № 3. – C. 2653-2675.

24. Elobeid A., Libard S., Leino M., Popova S. N., Alafuzoff I. Altered Proteins in the Aging Brain // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 2016. – T. 75, № 4. – C. 316-25.

25. Salas I. H., Burgado J., Allen N. J. Glia: victims or villains of the aging brain? // *Neurobiol Dis.* – 2020. – T. 143. – C. 105008.

26. Gomazkov O. Starenie mozga i neirotroficheskaya terapiya // *Brain Aging and Neurotrophic Therapy*), Moscow: IKAR. – 2011.

27. Bors L., Toth K., Toth E. Z., Bajza A., Csorba A., Szigeti K., Mathe D., Perlaki G., Orsi G., Toth G. K., Erdo F. Age-dependent changes at the blood-brain barrier. A Comparative structural and functional study in young adult and middle aged rats // *Brain Res Bull.* – 2018. – T. 139. – C. 269-277.

28. Mattson M. P., Arumugam T. V. Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States // *Cell Metab.* – 2018. – T. 27, № 6. – C. 1176-1199.

29. Khrapko K., Nekhaeva E., Kraytsberg Y., Kunz W. Clonal expansions of mitochondrial genomes: implications for in vivo mutational spectra // *Mutat Res.* – 2003. – T. 522, № 1-2. – C. 13-9.

30. Skulachev V. P. Phenoptosis: programmed death of an organism // *Biochemistry (Mosc).* – 1999. – T. 64, № 12. – C. 1418-26.

31. Johnson F. B., Sinclair D. A., Guarente L. Molecular biology of aging // *Cell.* – 1999. – T. 96, № 2. – C. 291-302.

32. Mecocci P., MacGarvey U., Kaufman A. E., Koontz D., Shoffner J. M., Wallace D. C., Beal M. F. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain // *Ann Neurol.* – 1993. – T. 34, № 4. – C. 609-16.

33. Schmitz C., Axmacher B., Zunker U., Korr H. Age-related changes of DNA repair and mitochondrial DNA synthesis in the mouse brain // *Acta Neuropathol.* – 1999. – T. 97, № 1. – C. 71-81.

34. Miquel J., Economos A. C., Fleming J., Johnson J. E., Jr. Mitochondrial role in cell aging // *Exp Gerontol.* – 1980. – T. 15, № 6. – C. 575-91.
35. Correia-Melo C., Marques F. D., Anderson R., Hewitt G., Hewitt R., Cole J., Carroll B. M., Miwa S., Birch J., Merz A., Rushton M. D., Charles M., Jurk D., Tait S. W., Czapiewski R., Greaves L., Nelson G., Bohlooly Y. M., Rodriguez-Cuenca S., Vidal-Puig A., Mann D., Saretzki G., Quarato G., Green D. R., Adams P. D., von Zglinicki T., Korolchuk V. I., Passos J. F. Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype // *EMBO J.* – 2016. – T. 35, № 7. – C. 724-42.
36. Wu L., Xiong X., Wu X., Ye Y., Jian Z., Zhi Z., Gu L. Targeting Oxidative Stress and Inflammation to Prevent Ischemia-Reperfusion Injury // *Front Mol Neurosci.* – 2020. – T. 13. – C. 28.
37. Sastre J., Pallardo F. V., Pla R., Pellin A., Juan G., O'Connor J. E., Estrela J. M., Miquel J., Vina J. Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes // *Hepatology.* – 1996. – T. 24, № 5. – C. 1199-205.
38. Hagen T. M., Yowe D. L., Bartholomew J. C., Wehr C. M., Do K. L., Park J. Y., Ames B. N. Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1997. – T. 94, № 7. – C. 3064-9.
39. Cenini G., Lloret A., Cascella R. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From a Mitochondrial Point of View // *Oxid Med Cell Longev.* – 2019. – T. 2019. – C. 2105607.
40. Pinto M., Moraes C. T. Mechanisms linking mtDNA damage and aging // *Free Radic Biol Med.* – 2015. – T. 85. – C. 250-8.
41. Mecocci P., Boccardi V., Cecchetti R., Bastiani P., Scamosci M., Ruggiero C., Baroni M. A Long Journey into Aging, Brain Aging, and Alzheimer's Disease Following the Oxidative Stress Tracks // *J Alzheimers Dis.* – 2018. – T. 62, № 3. – C. 1319-1335.
42. Yin F., Sancheti H., Patil I., Cadenas E. Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease // *Free Radic Biol Med.* – 2016. – T. 100. – C. 108-122.

43. Floyd R. A., Carney J. M. Age influence on oxidative events during brain ischemia/reperfusion // *Arch Gerontol Geriatr.* – 1991. – Т. 12, № 2-3. – С. 155-77.
44. Xing C., Arai K., Lo E. H., Hommel M. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke // *Int J Stroke.* – 2012. – Т. 7, № 5. – С. 378-85.
45. Пожилова Е. В., Новиков В. Е., Левченкова О. С. Активные формы кислорода в физиологии и патологии клетки // *Вестник Смоленской государственной медицинской академии.* – 2015. – Т. 14, № 2.
46. Belanger M., Allaman I., Magistretti P. J. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation // *Cell Metab.* – 2011. – Т. 14, № 6. – С. 724-38.
47. Болдырев А. Окислительный стресс и мозг // *Соросовский образовательный журнал.* – 2001. – Т. 7, № 4. – С. 21-28.
48. Abramov A. Y., Scorziello A., Duchen M. R. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation // *J Neurosci.* – 2007. – Т. 27, № 5. – С. 1129-38.
49. Granger D. N., Kvietys P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept // *Redox Biol.* – 2015. – Т. 6. – С. 524-551.
50. Kinugasa Y., Ogino K., Furuse Y., Shiomi T., Tsutsui H., Yamamoto T., Igawa O., Hisatome I., Shigemasa C. Allopurinol improves cardiac dysfunction after ischemia-reperfusion via reduction of oxidative stress in isolated perfused rat hearts // *Circ J.* – 2003. – Т. 67, № 9. – С. 781-7.
51. Abramov A. Y., Jacobson J., Wientjes F., Hotherhall J., Canevari L., Duchen M. R. Expression and modulation of an NADPH oxidase in mammalian astrocytes // *J Neurosci.* – 2005. – Т. 25, № 40. – С. 9176-84.
52. Богданов М., Воронцова Н., Матвеева В., Головкин А., Ларионов М., Григорьев Е. Динамика показателей окислительного стресса и эндогенной интоксикации в венечном синусе и периферической крови у пациентов ИБС во время аортокоронарного шунтирования // *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* – 2013. № 4.

53. Kryl'skii E. D., Popova T. N., Safonova O. A., Stolyarova A. O., Razuvaev G. A., de Carvalho M. A. P. Transcriptional Regulation of Antioxidant Enzymes Activity and Modulation of Oxidative Stress by Melatonin in Rats Under Cerebral Ischemia / Reperfusion Conditions // *Neuroscience*. – 2019. – Т. 406. – С. 653-666.
54. Волыхина В., Шафрановская Е. Супероксиддисмутазы: структура и свойства // *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. – 2009. – Т. 8, № 4.
55. Lalkovicova M., Danielisova V. Neuroprotection and antioxidants // *Neural Regen Res*. – 2016. – Т. 11, № 6. – С. 865-74.
56. Packer L., Tritschler H. J., Wessel K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid // *Free Radic Biol Med*. – 1997. – Т. 22, № 1-2. – С. 359-78.
57. Teleanu R. I., Chircov C., Grumezescu A. M., Volceanov A., Teleanu D. M. Antioxidant Therapies for Neuroprotection-A Review // *J Clin Med*. – 2019. – Т. 8, № 10.
58. Taylor R. C., Cullen S. P., Martin S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2008. – Т. 9, № 3. – С. 231-41.
59. Chandra J., Samali A., Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress // *Free Radic Biol Med*. – 2000. – Т. 29, № 3-4. – С. 323-33.
60. Sawhney M., Mathew M., Valarmathi M. T., Das S. N. Age related changes in Fas (CD95) and Fas ligand gene expression and cytokine profiles in healthy Indians // *Asian Pac J Allergy Immunol*. – 2006. – Т. 24, № 1. – С. 47-56.
61. Loh K. P., Huang S. H., De Silva R., Tan B. K., Zhu Y. Z. Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury // *Curr Alzheimer Res*. – 2006. – Т. 3, № 4. – С. 327-37.
62. Sakamoto A., Ohnishi S. T., Ohnishi T., Ogawa R. Relationship between free radical production and lipid peroxidation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain // *Brain Res*. – 1991. – Т. 554, № 1-2. – С. 186-92.
63. Зорина И., Галкина О., Баюнова Л., Захарова И. Влияние инсулина на уровень перекисного окисления липидов и содержание глутатиона при

двухсосудистой ишемии переднего мозга крыс и реперфузии // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2019. – Т. 55, № 4. – С. 299–301-299–301.

64. Wang Q., Tompkins K. D., Simonyi A., Korthuis R. J., Sun A. Y., Sun G. Y. Apocynin protects against global cerebral ischemia-reperfusion-induced oxidative stress and injury in the gerbil hippocampus // Brain Res. – 2006. – Т. 1090, № 1. – С. 182-9.

65. Ravindran S., Kurian G. A. Eventual analysis of global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat brain: a paradigm of a shift in stress and its influence on cognitive functions // Cell Stress Chaperones. – 2019. – Т. 24, № 3. – С. 581-594.

66. Зорина И., Захарова И., Баюнова Л., Аврова Н. Введение инсулина крысам предотвращает накопление диеновых и триеновых конъюгатов и инактивацию Na⁺, K⁺-АТФ-азы в коре мозга при двухсосудистой ишемии переднего мозга и реперфузии. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2018. – Т. 54, № 3. – С. 215-217.

67. Gawel S., Wardas M., Niedworok E., Wardas P. [Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker] // Wiad Lek. – 2004. – Т. 57, № 9-10. – С. 453-5.

68. Ergun R., Akdemir G., Sen S., Tasci A., Ergungor F. Neuroprotective effects of propofol following global cerebral ischemia in rats // Neurosurg Rev. – 2002. – Т. 25, № 1-2. – С. 95-8.

69. Nita D. A., Nita V., Spulber S., Moldovan M., Popa D. P., Zagrean A. M., Zagrean L. Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion - a biochemical study in rat // J Cell Mol Med. – 2001. – Т. 5, № 2. – С. 163-70.

70. Schimidt H. L., Vieira A., Altermann C., Martins A., Sosa P., Santos F. W., Mello-Carpes P. B., Izquierdo I., Carpes F. P. Memory deficits and oxidative stress in cerebral ischemia-reperfusion: neuroprotective role of physical exercise and green tea supplementation // Neurobiol Learn Mem. – 2014. – Т. 114. – С. 242-50.

71. Бахтюков А., Рыжов Ю., Зорина И. Изучение влияния инсулина на уровень экспрессии генов SOD1 и SOD2 при двухсосудистой ишемии и реперфузии

мозга крыс // Современные аспекты интегративной физиологии –, 2018. – С. 23-24.

72. Ghosh A., Sarkar S., Mandal A. K., Das N. Neuroprotective role of nanoencapsulated quercetin in combating ischemia-reperfusion induced neuronal damage in young and aged rats // PLoS One. – 2013. – Т. 8, № 4. – С. e57735.

73. Sarkar S., Mukherjee A., Das N., Swarnakar S. Protective roles of nanomelatonin in cerebral ischemia-reperfusion of aged brain: Matrixmetalloproteinases as regulators // Exp Gerontol. – 2017. – Т. 92. – С. 13-22.

74. Semsei I., Rao G., Richardson A. Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brain as a function of age // Mech Ageing Dev. – 1991. – Т. 58, № 1. – С. 13-9.

75. Wen J., Watanabe K., Ma M., Yamaguchi K., Tachikawa H., Kodama M., Aizawa Y. Edaravone inhibits JNK-c-Jun pathway and restores anti-oxidative defense after ischemia-reperfusion injury in aged rats // Biol Pharm Bull. – 2006. – Т. 29, № 4. – С. 713-8.

76. Raval A. P., Liu C., Hu B. R. Rat model of global cerebral ischemia: the two-vessel occlusion (2VO) model of forebrain ischemia // Animal models of acute neurological injuries Springer, 2009. – С. 77-86.

77. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // J Biol Chem. – 1957. – Т. 226, № 1. – С. 497-509.

78. Галкина О., Путилина Ф., Романова А., Ещенко Н. Изменения перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы головного мозга крыс в ходе раннего постнатального развития // Нейрохимия. – 2009. – Т. 26, № 2. – С. 111-116.

79. Гаврилов В., Гаврилова А., Магуль Л. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой // Вопросы медицинской химии. – 1987. – Т. 33, № 1. – С. 118-122.

80. Leon A., Facci L., Toffano G., Sonnino S., Tettamanti G. Activation of (Na⁺, K⁺)-ATPase by nanomolar concentrations of GM1 ganglioside // J Neurochem. – 1981. – Т. 37, № 2. – С. 350-7.
81. Болдырев А. Na/K-АТФаза—свойства и биологическая роль // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – Т. 4. – С. 2.
82. Clausen M. V., Hilbers F., Poulsen H. The Structure and Function of the Na,K-ATPase Isoforms in Health and Disease // Front Physiol. – 2017. – Т. 8. – С. 371.
83. Erecinska M., Silver I. A. Ions and energy in mammalian brain // Prog Neurobiol. – 1994. – Т. 43, № 1. – С. 37-71.
84. Huang W. H., Wang Y., Askari A. (Na⁺,K⁺)-ATPase: inactivation and degradation induced by oxygen radicals // Int J Biochem. – 1992. – Т. 24, № 4. – С. 621-6.
85. Ferrer I., Friguls B., Dalfo E., Justicia C., Planas A. M. Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat // Neuropathol Appl Neurobiol. – 2003. – Т. 29, № 5. – С. 472-81.
86. Mungrue I. N., Bredt D. S. nNOS at a glance: implications for brain and brawn // J Cell Sci. – 2004. – Т. 117, № Pt 13. – С. 2627-9.
87. Huang Z., Huang P. L., Panahian N., Dalkara T., Fishman M. C., Moskowitz M. A. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase // Science. – 1994. – Т. 265, № 5180. – С. 1883-5.
88. Di J. H., Li C., Yu H. M., Zheng J. N., Zhang G. Y. nNOS downregulation attenuates neuronal apoptosis by inhibiting nNOS-GluR6 interaction and GluR6 nitrosylation in cerebral ischemic reperfusion // Biochem Biophys Res Commun. – 2012. – Т. 420, № 3. – С. 594-9.
89. Shao S., Xu M., Zhou J., Ge X., Chen G., Guo L., Luo L., Li K., Zhu Z., Zhang F. Atorvastatin Attenuates Ischemia/Reperfusion-Induced Hippocampal Neurons Injury Via Akt-nNOS-JNK Signaling Pathway // Cell Mol Neurobiol. – 2017. – Т. 37, № 4. – С. 753-762.

90. Komeima K., Usui S., Shen J., Rogers B. S., Campochiaro P. A. Blockade of neuronal nitric oxide synthase reduces cone cell death in a model of retinitis pigmentosa // *Free Radic Biol Med.* – 2008. – T. 45, № 6. – C. 905-12.
91. Santizo R., Baughman V. L., Pelligrino D. A. Relative contributions from neuronal and endothelial nitric oxide synthases to regional cerebral blood flow changes during forebrain ischemia in rats // *Neuroreport.* – 2000. – T. 11, № 7. – C. 1549-53.

ПРИЛОЖЕНИЕ

По данным, полученным в исследовании, были опубликованы следующие статьи и тезисы:

1. Зорина И. И., Фокина Е. А. и др. Особенности изменений перекисного окисления липидов и активности Na^+/K^+ -АТФазы в коре мозга у старых крыс в условиях двухсосудистой церебральной ишемии/реперфузии //Успехи геронтологии. – 2019. – Т. 32. – №. 6. – С. 941-947.
2. Рыжов Ю. Р., Фокина Е. А., Зорина И. И. Влияние реперфузии различной длительности на содержание продуктов перекисного окисления липидов в коре мозга старых крыс после двухсосудистой ишемии переднего мозга //Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты. – 2019. – С. 232-233.
3. Zorina I. I., Fokina E. A. et al. Characteristics of Changes in Lipid Peroxidation and Na^+/K^+ -ATPase Activity in the Cortex of Old Rats in Conditions of Two-Vessel Cerebral Ischemia/Reperfusion //Advances in Gerontology. – 2020. – Т. 10. – №. 2. – С. 156-161.
4. Фокина Е. А., Зорина И. И. Особенности экспрессии генов выживаемости нейронами коры головного мозга стареющих крыс, подвергнутых двухсосудистой ишемии переднего мозга //Материалы научной конференции «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье». – 2021. – С. 624-625.